REF 14 109

ATB® BLSE

IVD

Mise en évidence des ß-lactamases à spectre étendu chez les entérobactéries

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

La galerie ATB BLSE permet de mettre en évidence la présence de ß-lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries.
Elle est utilisée en complément de l'antibiogramme des entérobactéries en cas de suspicion de BLSE.

PRINCIPE

La galerie ATB BLSE comporte 16 paires de cupules. La première paire, sans antibiotique, sert de témoin de croissance. Les 15 suivantes contiennent des antibiotiques à plusieurs concentrations.
Le test consiste en la mise en évidence d'une synergie entre Ceftazidime ou Aztréonam et un inhibiteur de ß-lactamases (Sulbactam). La synergie est montrée par un abaissement des CMI en présence de l'inhibiteur.
La bactérie à tester est mise en suspension puis transférée dans le milieu de culture et inoculée dans la galerie. Après incubation, la lecture de la croissance se fait soit visuellement, soit avec l'automate ATB ou ***mini API*** ®.

PRESENTATION (Coffret pour 10 tests) :

- 10 galeries ATB BLSE en emballage individuel avec déshydratant
- 10 couvercles d'incubation
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie ATB BLSE est mentionnée dans le « Tableau d'Interprétation » de cette notice.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs et instruments

- API® Suspension Medium (Réf. 70 700 ou 70 640 ou 20 150) ou
  API® NaCl 0,85 % Medium (Réf. 20 070 ou 20 040 ou 20 230)
  [en fonction de la galerie d'identification utilisée]
- ATB Medium (Réf. 14 960 ou 14 920)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) ou DENSIMAT (Réf. 99 234) ou Densitomètre ATB
- Pipette Electronique ATB (consulter bioMérieux) ou Inoculateur ATB et Embouts (Réf. 15 710)
- Automate ATB ou ***mini API ®*** avec logiciel (consulter bioMérieux)

Matériel

- Oeses calibrées de 10 µl ou pipette
- Protège-ampoules
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Pour diagnostic *in vitro* uniquement.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue*; *Approved Guideline* - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)," ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des galeries.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, …
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation et la validation des résultats de l'antibiogramme doit être faite en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, de l'identification de la souche, éventuellement des résultats de tests complémentaires et des recommandations locales en vigueur.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries se conservent à 2-8°C à l'obscurité jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur le coffret.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

La galerie ATB BLSE ne doit pas être utilisée directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.
Les microorganismes à tester doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Préparation de la galerie

- Sortir la galerie de son emballage.
- Noter l'identifiant de la bactérie à tester sur la languette latérale de la galerie.

Préparation de l'inoculum

- Préparer une suspension bactérienne d'opacité équivalente à l'étalon 0,5 de McFarland. Comparer au témoin d'opacité du kit McFarland Standard ou utiliser le Densitomètre ATB ou le DENSIMAT (se reporter au manuel d'utilisation).

Deux méthodes :
- culture en bouillon jusqu'à obtention de l'opacité indiquée ;
- mise en suspension de 1 ou plusieurs colonies (utiliser préférentiellement des souches fraîchement cultivées) dans une ampoule d' API® Suspension Medium ou d' API® NaCl 0,85 % Medium (ouvrir l'ampoule comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit).
  Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : il est recommandé de contrôler la pureté de l'inoculum et de réisoler dans le cas de cultures mixtes.

- Transférer 10 µl de cette suspension dans ATB Medium à l'aide d'une oese calibrée ou d'une pipette.

Inoculation de la galerie

- Inoculation MANUELLE :
  - Homogénéiser ATB Medium avec la Pipette Electronique ATB en évitant la formation de bulles.
  - Inoculer la galerie en distribuant 135 µl d'ATB Medium par cupule avec la Pipette Electronique ATB (environ 2 x 10^5 germes/ml ou 3 x 10^4 germes/cupule).
- Inoculation AUTOMATIQUE

  Se reporter au manuel d'utilisation de l'inoculateur ATB.
- Mettre un couvercle sur la galerie.
- Incuber 18-24 heures à 36 ± 2°C en aérobiose.

LECTURE ET INTERPRETATION

L'interprétation des tests de mise en évidence d'une ß-lactamase à spectre étendu est à réaliser par l'utilisateur par comparaison des CMI de l'antibiotique seul et en présence de l'inhibiteur.

Détermination de la C.M.I. :

- Aztréonam (ATM)
- Ceftazidime (CAZ)
- Aztréonam + Sulbactam (SATM)
- Ceftazidime + Sulbactam (SCAZ)

Pour les concentrations, voir Tableau d'Interprétation.

La CMI est déterminée par la plus basse concentration sans culture visible.

Tests de mise en évidence d'une BLSE :

- Inhibiteur : Sulbactam
- Antibiotiques : Aztréonam (ATM) et Ceftazidime (CAZ)

La mise en évidence d'une BLSE repose sur 2 antibiotiques, ou tests, pour obtenir une meilleure détection.

<u>Test positif (P)</u> :

Un test est dit positif lorsque l'on observe un écart de 4 dilutions au moins entre l'antibiotique testé seul et l'antibiotique en présence d'inhibiteur ; cet écart de CMI peut être observé sur le couple Aztréonam/Aztréonam-Sulbactam et/ou Ceftazidime/Ceftazidime-Sulbactam.

<u>Test négatif (N)</u> :

Un test est dit négatif dans les 2 cas suivants :
- écart inférieur ou égal à 3 dilutions entre l'antibiotique testé seul (Aztréonam ou Ceftazidime) et l'antibiotique en présence d'inhibiteur (Sulbactam).
- la CMI de la Ceftazidime ou de l'Aztréonam est ≤ 0,5 mg/l.

<u>Test non informatif (NI)</u> :

Un test est dit non informatif dans le cas suivant :
CMI Aztréonam > 8 mg/l et
CMI Aztréonam-Sulbactam > 1 mg/l
ou
CMI Ceftazidime > 32 mg/l et
CMI Ceftazidime-Sulbactam > 4 mg/l.

La présence de BLSE (ß-lactamase à spectre étendu) est établie sur la base d'au moins un test positif. Soient les cas : P+P ou P+N ou P+NI.
En pratique, grâce au décalage des concentrations, une BLSE est signée par une croissance dans la cupule de gauche et une absence de croissance dans la cupule de droite (voir Tableau d'Interprétation pour exemple).

L'absence de BLSE est établie sur la base de 2 tests négatifs. Soit le cas : N+N.

Le résultat indéterminé (on ne peut pas exclure une BLSE) est établi dans le cas d'une association entre 2 tests non informatifs ou d'un test non informatif et d'un test négatif. Soient les cas : NI+NI ou N+NI.

Autres tests :

- Céfotétan (CTT)
- Imipénème (IMI)
- Céfotaxime + Sulbactam (SCTX1, SCTX2)

Rechercher dans chaque cupule la présence d'un trouble (+) par lecture visuelle ou automatique par l'automate ATB ou ***mini API*** **®** (se reporter aux manuels d'utilisation).

Pour les antibiotiques testés à deux concentrations (CTT, IMI) :

Aspect des cupules		Résultats		La souche est :	
c	C	c	C		
clair	clair	–	–	S	SENSIBLE
trouble	clair	+	–	I	INTERMEDIAIRE
trouble	trouble	+	+	R	RESISTANTE

Pour les antibiotiques testés à une seule concentration (SCTX1, SCTX2) :

Aspect de la cupule	Résultat	La souche est :	
clair	–	S	SENSIBLE
trouble	+	R	RESISTANTE

Les tests SCTX1 et SCTX2 permettent de mesurer le niveau de restauration de l'activité du Céfotaxime (CTX) en présence de Sulbactam (S) chez les entérobactéries productrices de BLSE, sans préjuger du succès ou de l'échec thérapeutique en cas d'utilisation de ces molécules en l'association. Pour l'interprétation des résultats, 4 cas de figure peuvent se présenter :
- SCTX1 Sensible et SCTX2 Sensible : restauration d'activité complète.
- SCTX1 Résistant et SCTX2 Sensible : restauration d'activité partielle.
- SCTX1 Résistant et SCTX2 Résistant : restauration d'activité incomplète ou absence de restauration.
- SCTX1 Sensible et SCTX2 Résistant : résultat non interprétable.

NOTES :

- Avant d'effectuer la lecture automatique, il est conseillé d'essuyer les éventuelles gouttelettes sur la partie centrale de la galerie afin de permettre la reconnaissance du code de la galerie par le lecteur.
- L'absence de croissance dans une (ou deux) cupule(s)-témoin invalide l'antibiogramme qui doit être recommencé.
- Un résultat c(–)C(+) est un non-sens (N) : répéter le test avec une nouvelle galerie.
- En lecture visuelle, une croissance limitée à la périphérie de la cupule doit être lue négative.
- Une galerie dont les cupules sont partiellement desséchées suite à l'incubation peut induire de faux résultats. L'antibiogramme doit être recommencé.

CONTROLE DE QUALITE

Pour vérifier la standardisation de la méthode suivie, des contrôles de qualité périodiques avec les souches tests indiquées pour cette galerie doivent être réalisés (voir tableau Contrôle de Qualité de cette notice).
Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Un temps d'attente entre les diverses étapes de la manipulation (de la préparation de l'inoculum à l'incubation de la galerie) peut affecter les résultats.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées. Des cultures mixtes ou contaminées peuvent affecter les résultats.
- Chez certains genres d'entérobactéries, les BLSE sont parfois exprimées en association avec une hyperproduction de céphalosporinase (par exemple *Enterobacter*) ; le résultat obtenu dans un tel cas entre dans la catégorie "Test non informatif (NI)", décrit précédemment.
- Chez de rares souches, les BLSE peuvent être exprimées à très bas niveau (notamment *Proteus* et apparentés). Dans ce cas on observe une absence de croissance dans toutes les cupules Aztréonam (CMI ≤ 0,5 mg/l) et Aztréonam-Sulbactam (CMI ≤ 0,06 mg/l) et dans toutes les cupules Ceftazidime (CMI ≤ 0,5 mg/l) et Ceftazidime-Sulbactam (CMI ≤ 0,06 mg/l).

RESULTATS ATTENDUS

Les profils de résistance des tests antibiotiques variant en fonction de la zone géographique, les résultats attendus sont donc directement dépendants de l'écologie microbienne locale (espèces / mécanismes de résistance).

PERFORMANCES

Les performances de la galerie ATB BLSE ont été déterminées en utilisant deux souchiers comprenant les genres bactériens ou espèces suivants :

Souchier 1 :

- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella ozanae*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus mirabillis*
- *Serratia marcescens*

Souchier 2 :

- *Escherichia*
- *Cedecea*
- *Enterobacter*
- *Hafnia*
- *Klebsiella*
- *Citrobacter*
- *Proteus*
- *Morganella*
- *Providencia*
- *Serratia*
- *Yersinia*

Le premier souchier a permis d'établir le taux de détection par la galerie ATB BLSE des souches productrices de ß-lactamase à spectre étendu.
Le second souchier a permis d'établir le taux de concordance des catégorisations pour le Céfotétan (CTT) et l'Imipénème (IMI). Les catégorisations de référence ont été déterminées à partir des résultats de CMI établies avec la méthode de dilution en gélose, et comparées à celles obtenues avec ces tests. Il y a concordance lorsque les catégorisations cliniques des deux méthodes sont identiques.

Détection des BLSE

L'étude portant sur 108 souches d'entérobactéries a montré que la galerie ATB BLSE détecte correctement 88 % d'entre elles. Dans 11 % des cas, le résultat était indéterminé et dans 1 % des cas, faussement négatif.

Taux de concordance

Le taux de concordance des tests CTT et IMI obtenu à partir de 100 souches est de 96 %.
Aucune erreur majeure ou très majeure n'a été mise en évidence.

ELIMINATION DES DECHETS

Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.
Eliminer les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.
Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU D'INTERPRETATION

CUPULE			ANTIBIOTIQUE		mg/l		INTERPRETATION & COMMENTAIRES		
1	ATM	SATM	Aztréonam	Aztréonam + Sulbactam	0,5	0,06	+	+	CMI ATM = 8 mg/l CMI SATM = 0,5 mg/l donc BLSE (+) : la CMI passe de 8 à 0.5 (4 dilutions)
2	ATM	SATM	Aztréonam	Aztréonam + Sulbactam	1	0,12	+	+	
3	ATM	SATM	Aztréonam	Aztréonam + Sulbactam	2	0,25	+	+	
4	ATM	SATM	Aztréonam	Aztréonam + Sulbactam	4	0,5	+	–	
5	ATM	SATM	Aztréonam	Aztréonam + Sulbactam	8	1	–	–	
6	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	0,5	0,06	+	+	CMI CAZ = 32 mg/l CMI SCAZ = 1 mg/l donc BLSE (+) : la CMI passe de 32 à 1 (5 dilutions)
7	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	1	0,12	+	+	
8	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	2	0,25	+	+	
9	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	4	0,5	+	+	
10	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	8	1	+	–	
11	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	16	2	+	–	
12	CAZ	SCAZ	Ceftazidime	Ceftazidime + Sulbactam	32	4	–	–	
13	CTT	CTT	Céfotétan	Céfotétan	4	32			
14	IMI	IMI	Imipénème	Imipénème	4	8			
15	SCTX1	SCTX2	Céfotaxime + Sulbactam	Céfotaxime + Sulbactam	0,06	0,12			

CONTROLE QUALITE

	ATM / SATM	CAZ / SCAZ	CTT	IMI	SCTX1	SCTX2
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Test positif	Test positif	S	S	R	S/R
Escherichia coli ATCC 25922	Test négatif	Test négatif	S	S	S	S



bioMérieux® sa
au capital de 11 879 045 €
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com



Imprimé en France